1 月 January
2020，63（1）：1－10

昆　虫　学　报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http：//www.insect.org.cn
doi：10.16380/j.kcxb.2020.01.001

烟草甲谷胱甘肽 *S*-转移酶基因 *LsGSTe*1 的表达及其与甲酸乙酯耐受性的关系

严　毅[1,2]，许抗抗[1,2]，杨　洪[1,3,*]，胡大鸣[4]，杨文佳[1,2]

（1．贵州大学昆虫研究所，贵州山地农业病虫害重点实验室，贵阳 550025；
2．贵阳学院生物与环境工程学院，贵州省山地珍稀动物与经济昆虫重点实验室，贵阳 550005；
3．贵州大学烟草学院，贵阳 550025；4．贵州中烟工业有限责任公司，贵阳 550025）

摘要：【目的】探究烟草甲 *Lasioderma serricorne* 谷胱甘肽 *S*-转移酶（glutathione *S*-transferase，GST）基因 *LsGSTe*1 的分子特性和生物学功能。【方法】在烟草甲转录组数据的基础上，利用 RT-PCR 技术扩增 *LsGSTe*1 基因，并进行生物信息学分析；采用 qPCR 技术检测 *LsGSTe*1 在烟草甲不同发育阶段（低龄幼虫、高龄幼虫、蛹、低龄成虫、高龄成虫）及高龄幼虫不同组织（表皮、中肠、脂肪体、马氏管）中的表达水平，以及在甲酸乙酯熏蒸胁迫后的 5 龄幼虫中的表达变化。进一步采用 RNAi 技术沉默烟草甲 5 龄幼虫 *LsGSTe*1 基因，通过生物测定分析烟草甲对熏蒸剂甲酸乙酯的敏感性变化。【结果】获得 *LsGSTe*1 基因的全长 cDNA 序列（GenBank 登录号：MN480468），开放阅读框长 684 bp，编码 227 个氨基酸，N 端和 C 端均存在催化保守位点。系统发育分析表明该基因属于 GSTs 的 Epsilon 家族。qPCR 结果表明，*LsGSTe*1 在烟草甲不同发育阶段均有表达，且在高龄幼虫期的表达量较高；表达部位主要在幼虫脂肪体，其次为中肠和表皮，而在马氏管中的表达量最低。LC_{30}（10 μL/L）和 LC_{50}（20 μL/L）浓度的甲酸乙酯对烟草甲 5 龄幼虫熏蒸胁迫后，*LsGSTe*1 的表达水平显著升高，分别是对照组的 2.96 和 5.80 倍。RNAi 结果发现，RNAi 48 h 和 72 h 后，*LsGSTe*1 的表达量分别下降了 79.9% 和 83.0%，沉默效率显著；RNAi 72 h 后，ds*LsGSTe*1 注射组与对照（ds*GFP* 组）相比，LC_{50}浓度的甲酸乙酯处理 5 龄幼虫的死亡率明显提高了 32.4%。【结论】推测 *LsGSTe*1 基因可能参与了烟草甲对甲酸乙酯的代谢与解毒过程。

关键词：烟草甲；谷胱甘肽 *S*-转移酶；基因表达；甲酸乙酯；RNA 干扰

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296（2020）01-0001-10

Expression of glutathione *S*-transferase gene *LsGSTe*1 and its relationship with ethyl formate tolerance in the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae)

YAN Yi[1,2], XU Kang-Kang[1,2], YANG Hong[1,3,*], HU Da-Ming[4], YANG Wen-Jia[1,2] (1. Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Regions, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory for Rare Animal and Economic Insect of the Mountainous Region, College of Biology and Environmental Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China; 3. College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 4. China Tobacco Guizhou Industrial Co., Ltd., Guiyang 550025, China)

基金项目：国家自然科学基金项目（31501649）；贵州中烟工业有限责任公司计划项目（2017-25）；贵州省高等学校科技拔尖人才计划（黔教合 KY 字［2017］083）；贵州省教育厅青年科技人才成长项目（黔教合 KY 字［2018］298）

作者简介：严毅，男，1995 年 9 月生，福建建瓯人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生态学，E-mail：yanheyi95@163.com

* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：axyridis@163.com

收稿日期 Received：2019-10-11；接受日期 Accepted：2019-11-25

Abstract:【Aim】To explore the molecular characteristics and biological function of the glutathione *S*-transferase (GST) gene *LsGSTe*1 from the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*. 【Methods】Based on the transcriptome database of *L. serricorne*, the full-length cDNA of *LsGSTe*1 was cloned using RT-PCR and then subjected to bioinformatics analysis. The expression levels of *LsGSTe*1 in different developmental stages (early instar larva, late instar larva, pupa, callow adult, and mature adult) and different tissues (integument, midgut, fat body, and Malpighian tubules) of the late instar larvae of *L. serricorne*, and the changes in the expression level of *LsGSTe*1 in the 5th instar larvae after exposure to ethyl formate fumigation were detected via qPCR. The target gene *LsGSTe*1 in the 5th instar larvae of *L. serricorne* was further knocked down by RNAi, and the changes in the susceptibility of the larvae to ethyl formate fumigation were determined by insecticide bioassay. 【Results】The full-length cDNA sequence of *LsGSTe*1 in *L. serricorne* was cloned and deposited at GenBank under the accession number MN480468. The open reading frame of *LsGSTe*1 is 684 bp in length encoding a 227-amino-acid protein. LsGSTe1 has the conserved catalytic sites at the N-terminal domain and C-terminal domain. Phylogenetic analysis revealed that LsGSTe1 belongs to the Epsilon family of GSTs. The qPCR results showed that *LsGSTe*1 was constitutively expressed in the tested developmental stages and had a relatively higher expression level in the late instar larva. Tissue-specific expression profiles showed that the expression level of *LsGSTe*1 was the highest in the fat body, followed by in the midgut and integument, and the lowest in Malpighian tubules. The expression level of *LsGSTe*1 in the 5th instar larvae subjected to fumigation treatment with LC_{30}(10 μL/L) and LC_{50}(20 μL/L) of ethyl formate was significantly increased by 2.96 and 5.80 times as high as that of the control, respectively. RNAi results showed that the expression levels of *LsGSTe*1 were significantly reduced by 79.9% and 83.0% at 48 and 72 h after RNAi, respectively. The mortality of the 5th instar larvae treated with the LC_{50} of ethyl formate in the ds*LsGSTe*1 injection group at 72 h after RNAi increased by 32.4% as compared with that of the control group (ds*GFP* injection group). 【Conclusion】It is inferred that *LsGSTe*1 may be involved in the detoxification of ethyl formate in *L. serricorne*.

Key words: *Lasioderma serricorne*; glutathione *S*-transferase; gene expression; ethyl formate; RNA interference

烟草甲 *Lasioderma serricorne* 隶属于鞘翅目(Coleoptera)窃蠹科(Anobiidae),是烟草、粮食、中药材、茶叶等储藏期害虫的优势种,其发生危害具有较强的隐藏性(Li *et al*., 2009)。同时由于烟草甲繁殖力强、环境适应能力强等特性,其危害愈演愈烈,对多种储藏物造成了严重的经济损失(Imai and Masuda, 2017; Yang *et al*., 2019)。目前,烟草甲的防治主要以化学熏蒸为主,但化学药剂的长期不合理使用不仅导致其抗药性发展迅速,由此带来的食品安全和环境保护等问题也日益突出(Hori, 2003; Hironaka *et al*., 2017)。甲酸乙酯常温下为无色液体,是一种防治仓储害虫的新型熏蒸剂,具有杀虫快、毒性低、无残留等特点,并且多种储藏物会自然产生甲酸乙酯,因此该药剂的使用不会对储藏物的品质造成影响(Nicholas and Ebert, 2006)。自 2002 年登记注册以来,甲酸乙酯被广泛应用于谷蠹 *Rhyzopertha dominica*,赤拟谷盗 *Tribolium castarteum*,菜豆象 *Acanthoscelides obtectus*,嗜卷书虱 *Liposcelis bostrychophila* 和花斑皮蠹 *Trogoderma variabile* 等仓储害虫的防治,研究证实其防控害虫速效性优于磷化氢,且毒性低于磷化氢,因此该熏蒸剂将有望成为磷化氢的替代品(唐培安等, 2007; 王云果等, 2008; 姚洁等, 2016)。

谷胱甘肽 *S*-转移酶(glutathione *S*-transferases, GSTs, EC 2.5.1.18)是由多个基因编码的超家族酶系,几乎存在于所有的生物体内(Sheehan *et al*., 2001; Li *et al*., 2007)。根据其同源性和底物特异性,可将昆虫 GSTs 分为 7 个家族,包括 Sigma, Omega, Zeta, Epsilon, Delta 和 Theta 6 个已知家族和一个未知家族(Feng *et al*., 2001; 许抗抗等, 2017)。其中 Epsilon 和 Delta 是在昆虫中特异存在的家族,主要通过催化多种外源和内源的有毒疏水

化合物与还原型的谷胱甘肽共轭亲和，中和有毒物质亲电子中心，提高其水溶性，从而达到降低细胞毒性的目的（Agianian *et al*., 2003；Hu *et al*., 2014）。研究表明，家蚕 *Bombyx mori* 的 Epsilon 家族 GSTs 不仅参与有毒物质的解毒代谢过程，而且还具有抗氧化功能（Yu *et al*., 2008）。AgGSTe2 蛋白参与了 DDT 在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 体内的代谢，导致其抗药性的产生（Ortelli *et al*., 2003）。*GSTe*2，*GSTe*5 和 *GSTe*7 基因在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* DDT 抗性品系中过量表达，采用蛋白体外重组表达和 RNA 干扰（RNAi）技术，证明 GSTe5 蛋白可以有效代谢 DDT，而 *GSTe*2 和 *GSTe*7 与溴氰菊酯和 DDT 的解毒有一定相关性（Lumjuan *et al*., 2011）。由此，可以看出 Epsilon 家族 GSTs 基因在昆虫应对外源化合物胁迫和解毒代谢过程中起着重要作用。目前有关 Epsilon 家族 GSTs 基因参与昆虫对化学熏蒸剂解毒的分子机制研究较少。本研究在烟草甲转录组数据库的基础上，利用 RT-PCR 技术克隆获得 *LsGSTe*1 基因的 cDNA 全长序列，利用 qPCR 技术分析了该基因在烟草甲不同发育阶段、不同组织部位以及甲酸乙酯熏蒸胁迫后的表达特性，并采用 RNAi 技术研究其对甲酸乙酯的解毒特性。本研究初步探索了 *LsGSTe*1 在甲酸乙酯解毒过程中的作用，为新型分子靶标杀虫剂的开发提供了理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试烟草甲

烟草甲于 2010 年采自贵州省贵阳市（26°34′N，106°41′E），以中药材当归 *Angelica sinensis* 为食料在人工气候箱中连续饲养繁殖 50 代以上。气候箱参数为：温度 28 ± 1℃，相对湿度 75% ± 5%，光周期 0L: 24D。

1.2　主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit，DNase，cDNA 第 1 链合成试剂盒 PrimeScript® RT Reagent Kit 和 DNA 2000 Marker 均购自 TaKaRa 公司；感受态细胞 *Trans5*α，PCR 试剂盒 2 × EasyTaq PCR SuperMix 均购自全式金公司；胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司；载体 pGEM-T Easy Vector，qPCR 试剂盒GoTaq® qPCR Master Mix 均购自 Promega 公司；RNAi 试剂盒 TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit 购自 Thermo Scientific 公司；熏蒸剂甲酸乙酯购自 Aladdin 公司（无水级，≥98%）。

1.3　烟草甲总 RNA 提取与 cDNA 第 1 链合成

根据 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 说明书提取烟草甲的总 RNA，利用 NanoDrop 2000 核酸蛋白浓度测定仪（Thermo Scientific 公司）检测 RNA 的浓度和纯度，通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性，并利用 DNase 去除基因组 DNA。选取 OD_{260}/OD_{230} 和 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 ~ 2.2 的 RNA 于 −80℃保存备用。使用PrimeScript® RT Reagent Kit 合成 cDNA 第 1 链。

1.4　烟草甲 *LsGSTe*1 基因的克隆

根据烟草甲转录组获得的 1 个 Epsilon 家族 GST 基因的 Unigene 片段，采用 Primer 6.0 软件设计 1 对全长验证引物（表 1）扩增该基因的开放阅读框。PCR 反应体系：2 × Assembly Mix 25 μL，上下游引物（20 μmol/L）各 1 μL，cDNA 模板 2 μL，加 ddH_2O 补至总体积 50 μL。反应条件：95℃预变性 3 min；95℃变性 30 s，57℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，按照 Gel Extraction Mini Kit 说明书回收目的条带，并连接至 pGEM-T Easy 载体，再转化到 *Trans5*α 大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞中，经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定，将阳性克隆送成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

1.5　序列分析

采用 DNAMAN 6.0（Lynnon Biosoft）对测序结果进行编辑和分析，推导的氨基酸序列采用 BLAST 工具（http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/）进行同源性比对分析。利用 ProtParam（http://web.expasy.org/）和 NetNGlys 1.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/）分析编码蛋白的理化性质和 N-糖基化位点。利用 Prosite（http://prosite.expasy.org/）分析氨基酸的保守区域。经过 Clustal X 软件进行序列比对，使用 MEGA 6.06 软件中的邻接法（neighbor-joining）构建系统进化树，替代模型为泊松模型，各分支均进行 1 000 次的重复检验（Tamura *et al*., 2013）。

1.6　烟草甲 *LsGSTe*1 基因的时空表达

分别收集烟草甲低龄幼虫（卵孵化后 24 h 内）、高龄幼虫（4 龄以上）、蛹（化蛹后 48 h 以上）、低龄成虫（羽化后 24 h 内）和高龄成虫（羽化后 7 d），每个虫态设置 3 个生物学重复，每个重复 40 头试虫。解剖烟草甲高龄幼虫的表皮、中肠、脂肪体和马氏管共 4 种组织，每种组织设 3 个生物学重复，每个重复

分别解剖 50 头试虫。将上述材料经液氮速冻后保存于 –80℃冰箱,并按照 1.3 节方法分别提取所有样品的总 RNA 并进行 cDNA 制备。采用 qPCR 技术检测烟草甲 *LsGSTe*1 基因的时空表达,以 18S rRNA 基因为内参基因,引物序列见表 1。qPCR 扩增在 CFX96™ Real-Time System 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)中进行,技术重复 2 次。反应体系(20 μL):GoTaq® qPCR Master Mix 10 μL,cDNA 模板 1 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,ddH_2O 7 μL。混匀后轻微离心,扩增条件:95℃预变性5 min;然后 95℃变性 15 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环;最后在 60 ~ 95℃绘制熔解曲线,选取相关系数(R^2)大于 0.98 和扩增效率(E)在 90% ~110% 的引物备用。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5′–3′) Primer sequence	引物用途 Primer use
LsGSTe1-F	AGAAAATGGCACCTCAACTCTT	克隆开放阅读框 Cloning of open reading frame
LsGSTe1-R	TTGACTAGAATAAAATGAGTGT	
LsGSTe1-Q-F	AGGCTGCACTTCGATACAGG	qPCR
LsGSTe1-Q-R	ATAATTTCCAGCACGGCAAC	
18S-Q-F	GCATCTCCACGGATTTCACT	
18S-Q-R	AAGGCAAGACGCTTATCGAA	
ds-LsGSTe1-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>TCCGGAATACCTTAAGATTAATC	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
ds-LsGSTe1-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>AGTCTTTTCATGCGTTTCACCCA	
ds-GFP-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>CAGTTCTTGTTGAATTAGAT	
ds-GFP-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>AATGTTACCATCTTCTTTAA	

下划线为 T7 启动子序列。T7 promoter sequence is underlined.

1.7 甲酸乙酯胁迫后烟草甲 *LsGSTe*1 基因的表达

熏蒸处理参照广口瓶密闭法(唐培安等,2007),用细毛笔轻轻挑取 30 头 5 龄幼虫于 50 mL 无盖塑料离心管内,加入 40 g 当归作为食料,用 160 目纱网做成的离心管盖用皮筋绑在螺口处,放于 1 000 mL广口瓶中,将剪好的大小一致的滤纸放置广口瓶底部,用移液器点滴一定量的甲酸乙酯在滤纸上,并用凡士林涂抹在瓶口处密封盖紧瓶盖。将广口瓶置于人工气候箱培养观察,并统计甲酸乙酯熏蒸处理后烟草甲的存活与死亡数,根据前期预结果(数据另文发表)采用 2 个亚致死浓度 LC_{10}(5 μL/L)和 LC_{30}(10 μL/L),以及致死中浓度 LC_{50}(20 μL/L)的甲酸乙酯进行熏蒸处理,参考姚洁等(2016)24 h 后散气挑取存活的试虫,以相同条件下的空气处理作为对照,每处理 3 次重复。按照 1.3 节方法分别提取上述处理样品的 RNA 并合成 cDNA,按照 1.6 节方法进行 qPCR,检测 *LsGSTe*1 基因的表达。

1.8 烟草甲 *LsGSTe*1 基因的沉默及效率检测

烟草甲 *LsGSTe*1 基因 dsRNA (ds*LsGSTe*1)的体外合成按照使用 TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit 说明书进行,引物序列见表 1,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对合成的 dsRNA 进行检测。烟草甲主要以幼虫在寄主内取食危害,是害虫防治的关键时期,且前期 qPCR 结果表明 *LsGSTe*1 基因在烟草甲幼虫中高表达,所以选取大小均一、生长状况良好的烟草甲 5 龄幼虫进行 RNAi 实验,运用显微注射仪(World Precision Instruments 公司)沿着血液流动方向(头部向腹部方向),将 200 ng ds*LsGSTe*1 注射到 5 龄幼虫的倒数第 2 和第 3 腹节之间,注射等量的 ds*GFP* 作为对照组。每个处理 30 头试虫,分别在 48 和 72 h 收虫并冻存于 –80℃,按照 1.3 节方法分别提取上述处理样品的 RNA 并合成 cDNA,按照 1.6 节方法进行 qPCR,检测不同时间点 RNAi 的沉默效率。实验重复 3 次。

1.9 RNAi 干扰 *LsGSTe*1 后烟草甲对甲酸乙酯的敏感性分析

对分别注射 200 ng ds*LsGSTe*1 和 ds*GFP*(方法同 1.8 节)72 h 后的 5 龄幼虫进行甲酸乙酯 LC_{30}(10 μL/L)和 LC_{50}(20 μL/L)两个浓度毒力生物测定(同 1.7 节),每个处理 40 头试虫,24 h 后统计死亡率。实验重复 3 次。

1.10 数据分析

实验结果采用平均值 ± 标准误表示,数据处理采用 SPSS 23.0 软件。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算烟草甲 *LsGSTe*1 基因的相对表达量(Livak and Schmittgen,

2001)，将表达量最低的样品数值视为 1，其他样品的表达量以相对于最低表达量的倍数进行分析。烟草甲不同发育阶段、不同组织及甲酸乙酯处理后 mRNA 表达差异采用单因素方差分析(ANOVA)，$P<0.05$ 表示差异显著。dsRNA 注射后靶标基因 mRNA 表达和试虫敏感性测定采用 *T* 检验进行差异显著性分析，$P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异极显著。

2　结果

2.1　*LsGSTe*1 基因的克隆与序列分析

利用 RT-PCR 扩增获得烟草甲一个 GST 基因的 cDNA 全长序列，同源性比较确定该基因属于 GSTs 基因 Epsilon 家族，命名为 *LsGSTe*1(GenBank 登录号：MN480468)。*LsGSTe*1 开放阅读框长 684 bp，编码 227 个氨基酸，理论等电点为 5.15，预测蛋白质分子质量为 26.7 kD，且不存在 N-糖基化位点。Prosite 分析表明，*LsGSTe*1 编码的氨基酸具有 2 个谷胱甘肽 *S*-转移酶结合域的 2 个催化活性保守位点，第 1－84 位氨基酸为 N 末端结构域，第 90－215 位为 C 末端结构域(图 1)。

2.2　*LsGSTe*1 基因的序列比对和系统发育分析

LsGSTe1 氨基酸序列 BLAST 比对结果显示：LsGSTe1 与其他鞘翅目昆虫 Epsilon 家族 GSTs 的同源性较高，其中与黄粉虫 *Tenebrio molitor*(GenBank 登录号：AIL23539.1)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*(GenBank 登录号：XP_008190708.1)和白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis*(GenBank 登录号：XP_018333399.1) GST 氨基酸序列一致性分别为 59%，52% 和 48%。

将 LsGSTe1 与目前已经鉴定的其他昆虫(赤拟谷盗、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和家蚕) GSTs 氨基酸序列进行了聚类分析，结果显示 4 种昆虫的 18 个 GSTs 被分为 6 组(Delta，Sigma，Epsilon，Omega，Theta 和 Zeta)，其中 LsGSTe1 与同属于鞘翅目的赤拟谷盗的 TcGSTe15 的氨基酸序列一致性高达 74%，这表明 LsGSTe1 隶属于 Epsilon 家族(图 2)。

2.3　*LsGSTe*1 基因的时空表达

*LsGSTe*1 在烟草甲检测的所有发育阶段均有表达，其在高龄幼虫时期的表达量最高，显著高于其他发育阶段($P<0.05$)，是低龄成虫时期表达量的 5.6 倍，在低龄幼虫和蛹期表达量略低，而在低龄和高龄成虫期的表达量达到最低水平，显著低于其他发育阶段($P<0.05$)(图 3：A)。烟草甲 *LsGSTe*1 表达部位主要在幼虫脂肪体($P<0.05$)，其次为中肠和表皮，而在马氏管中的表达量最低(图 3：B)。

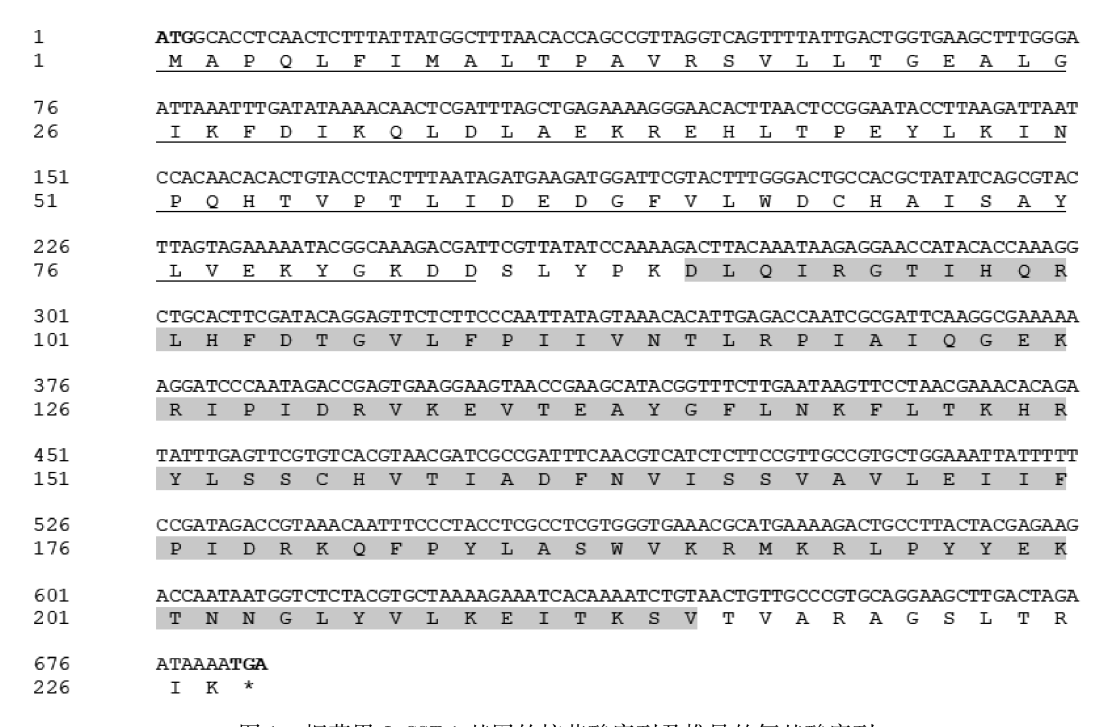


图 1　烟草甲 *LsGSTe*1 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *LsGSTe*1 in *Lasioderma serricorne*

下划线为 N 末端结构域；阴影表示 C 末端结构域；起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 加粗；星号表示终止密码子。The putative N-terminal domain is underlined and the C-terminal domain is shaded. The start codon ATG and the stop codon TGA are in bold, and the stop codon is indicated with an asterisk.

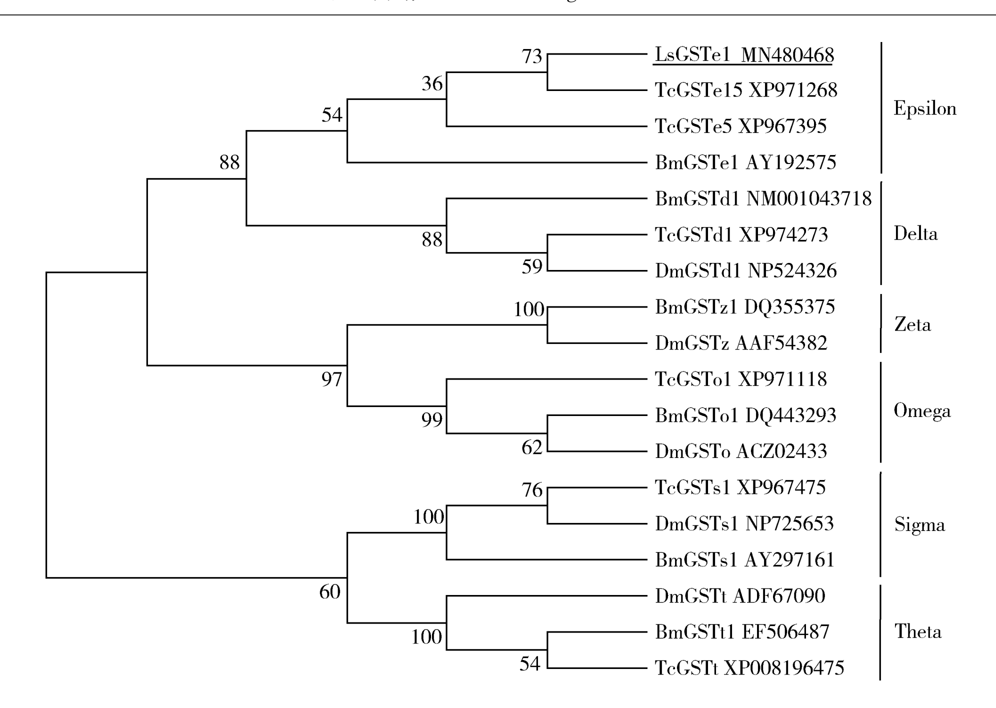


图 2 邻接法构建的基于烟草甲 LsGSTe1 和其他昆虫 GSTs 氨基酸序列的系统进化树(1 000 重复)

Fig. 2 Phylogenetic tree of LsGSTe1 from *Lasioderma serricorne* and GSTs from other insect species by neighbor-joining method based on the amino acid sequence (1 000 replicates)

Bm: 家蚕 *Bombyx mori*; Dm: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; Tc: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*.

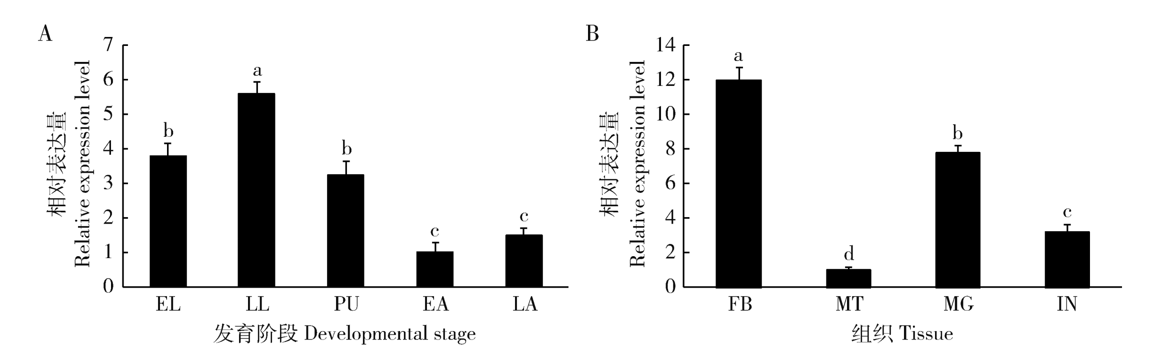


图 3 烟草甲 *LsGSTe*1 在不同发育阶段(A)和幼虫组织(B)中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *LsGSTe*1 in different developmental stages (A) and larval tissues (B) of *Lasioderma serricorne*

EL: 低龄幼虫 Early instar larva; LL: 高龄幼虫 Late instar larva; PU: 蛹 Pupa; EA: 低龄成虫 Callow adult; LA: 高龄成虫 Mature adult; FB: 脂肪体 Fat body; MT: 马氏管 Malpighian tubules; MG: 中肠 Midgut; IN: 表皮 Integument. 柱上不同字母表示基因表达量在不同发育阶段和幼虫不同组织间存在显著差异($P < 0.05$, LSD 检验)。Different letters above bars represent significant difference in the gene expression level between different developmental stages and larval tissues ($P < 0.05$, LSD test).

2.4 甲酸乙酯处理后烟草甲 *LsGSTe*1 基因的表达模式

烟草甲 5 龄幼虫受甲酸乙酯熏蒸胁迫后, LC_{30} (10 μL/L) 和 LC_{50} (20 μL/L) 浓度组 *LsGSTe*1 基因的表达量显著上调($P < 0.05$),分别是对照组的 2.96 和 5.80 倍;而 LC_{10} (5 μL/L) 浓度组与对照组的表达量在统计学上差异不显著($P > 0.05$)(图 4)。

2.5 RNAi 对 *LsGSTe*1 的沉默效率

采用 RNAi 技术沉默烟草甲 *LsGSTe*1 48 h 和 72 h 后,结合 qPCR 检测该基因 mRNA 的相对表达量。结果表明,与对照组相比,注射 48 h 和 72 h 后 *LsGSTe*1 表达量分别下降了 79.9% 和 83.0%,极显著低于对照($P < 0.01$),说明通过 RNAi 已经成功抑制该基因的表达(图 5)。

2.6 *LsGSTe*1 沉默后烟草甲 5 龄幼虫对甲酸乙酯的敏感性

通过生物测定实验结合 RNAi 技术,检测烟草甲对熏蒸剂甲酸乙酯的敏感性,研究烟草甲 *LsGSTe*1 对甲酸乙酯的解毒代谢作用。结果发现,甲酸乙酯 LC_{30} (10 μL/L) 熏蒸处理下 ds*LsGSTe*1 处

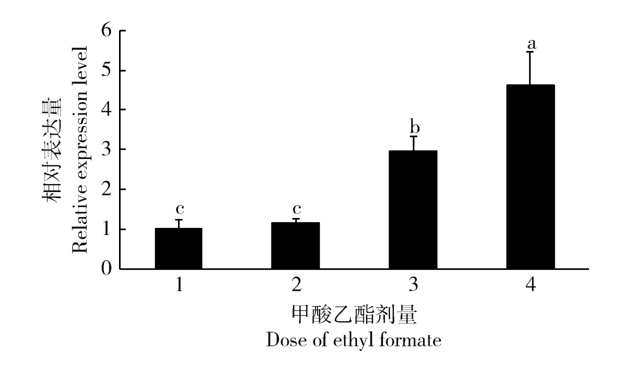


图 4　甲酸乙酯胁迫后烟草甲 5 龄幼虫 *LsGSTe*1 基因的相对表达水平

Fig. 4　Relative expression levels of *LsGSTe*1 in the 5th instar larvae of *Lasioderma serricorne* after exposure to ethyl formate

1: 空白对照 Blank control; 2: LC_{10}(5 μL/L); 3: LC_{30}(10 μL/L); 4: LC_{50}(20 μL/L). 柱上不同字母表示基因表达量在不同甲酸乙酯浓度处理间存在显著差异($P<0.05$, LSD 检验)。Different letters above bars represent significant difference in the gene expression level between different concentrations of ethyl formate ($P<0.05$, LSD test).

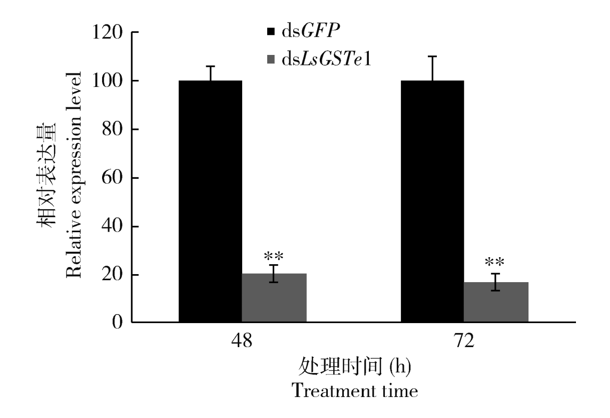


图 5　RNAi 对烟草甲 5 龄幼虫 *LsGSTe*1 基因沉默效率

Fig. 5　Silence efficiency of *LsGSTe*1 in the 5th instar larvae of *Lasioderma serricorne* by RNAi

柱上双星号表示基因表达量在对照组(注射 ds*GFP*)和 ds*LsGSTe*1 处理组之间存在极显著差异($P<0.01$, *T* 检验)。Double asterisk above bars means extremely significant difference in the gene expression level between the control (injection with ds*GFP*) and the ds*LsGSTe*1 injection group ($P<0.01$, *T*-test).

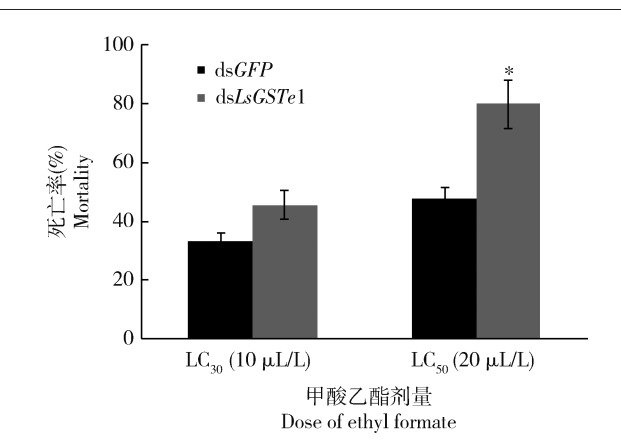


图 6　*LsGSTe*1 基因沉默后烟草甲 5 龄幼虫对甲酸乙酯的敏感性

Fig. 6　Susceptibility of the 5th instar larvae of *Lasioderma serricorne* to ethyl formate after silencing of *LsGSTe*1

柱上星号表示死亡率在对照组(注射 ds*GFP*)和 ds*LsGSTe*1 处理组之间存在显著差异($P<0.05$, *T* 检验)。The asterisk above bars means significant difference in the morality between the control (injection with ds*GFP*) and the ds*LsGSTe*1 injection group ($P<0.05$, *T*-test).

理组的死亡率达到 45.5%, 略高于对照组(ds*GFP* 注射组)的死亡率(33.3%), 差异不显著($P>0.05$); 甲酸乙酯 LC_{50}(20 μL/L)熏蒸处理下 ds*LsGSTe*1 处理组的死亡率(80.0%)显著高于 LC_{50} 熏蒸处理下对照组(ds*GFP* 注射组)的死亡率(47.6%)($P<0.05$)(图 6)。

3　讨论与结论

谷胱甘肽 S-转移酶是昆虫体内一种重要的多功能催化酶, 广泛参与到昆虫对外源杀虫剂的解毒代谢过程, 可被多种杀虫剂诱导表达(Hemingway *et al.*, 2004), 与杀虫剂耐受性相关的 GSTs 大多属于 Epsilon 和 Delta 家族(Samra *et al.*, 2012)。在埃及伊蚊中发现, DDT 和溴氰菊酯可诱导 *GSTe*2 和 *GSTe*7 基因的过表达, 在一定程度上表明 *GSTe*2 和 *GSTe*7 参与了 DDT 和溴氰菊酯的代谢解毒过程(Lumjuan *et al.*, 2005); 同样冈比亚按蚊体内多个 Epsilon 家族 GSTs 基因在 DDT 抗性品系中过量表达(Ortelli *et al.*, 2003); 黑腹果蝇体内 *DmGSTe*6 和 *DmGSTe*7 基因能够对甲基对硫磷进行代谢(Alias and Clark, 2010)。此外, 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*, 赤拟谷盗和中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 分别有 30, 36 和 28 个 GSTs 基因被鉴定, 其中 Epsilon 基因分别有 10, 19 和 12 个基因属于 Epsilon 家族, 但都缺乏进一步功能分析(Shi *et al.*, 2012; Keeling *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2016)。本研究发现, 烟草甲经甲酸乙酯 LC_{30}(10 μL/L)和 LC_{50}(20 μL/L)熏蒸处理后, 体内 *LsGSTe*1 基因表达水平分别上调 2.96 和 5.80 倍, 诱导的 *LsGSTe*1 高表达可能参与到甲酸乙酯的代谢过程。

基因的时空表达特性可在一定程度上反映基因的功能(Yang *et al.*, 2016a)。不同昆虫体内的 GSTs 基因在不同发育阶段的表达量变化差异较大。如小菜蛾 *Plutella xylostella GSTs*1 基因在卵和幼虫阶段

高表达，而在蛹和成虫阶段则不表达（You *et al.*, 2015）；相反的是，二化螟 *Chilo suppressalis* Sigma 家族的 GST 基因在成虫期高表达，在蛹和幼虫阶段表达量相对较低（Liu *et al.*, 2015）。在菜粉蝶 *Pieris rapae* 的研究中，发现 *PrGSTe*2，*PrGSTo*4，*PrGSTs*4 和 *PrGSTt*1 主要在 4 龄幼虫期表达，而 *PrGSTe*1 在 4 龄幼虫和蛹期高表达（Liu *et al.*, 2017）。本研究中 *LsGSTe*1 表达模式与 *PrGSTe*1 类似，暗示 *LsGSTe*1 可能更大程度地参与到成虫前期对寄主内部外源化合物的解毒代谢过程中。为进一步挖掘 *LsGSTe*1 的组织表达特性，本研究采用 qPCR 技术对 *LsGSTe*1 在烟草甲幼虫不同组织部位的表达模式进行解析，结果发现，*LsGSTe*1 在表皮、中肠、脂肪体和马氏管 4 个组织中均表达，且在脂肪体中表达量最高，相同的结果还出现在对小菜蛾、家蚕和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 的研究中（Yu *et al.*, 2008；Liu *et al.*, 2015；You *et al.*, 2015）。由于脂肪体是昆虫的主要储存能量器官，并在应对外源有毒物质的代谢过程中发挥着关键作用（Hou *et al.*, 2010），因此我们推测 *LsGSTe*1 在脂肪体中的高表达可能与外源杀虫剂的解毒代谢有关。

利用 RNAi 技术对昆虫 GST 家族基因进行功能分析，不仅可以为解析 GSTs 在杀虫剂解毒中的作用提供直接证据，而且有助于揭示 GSTs 介导的杀虫剂耐受性机制（Yu *et al.*, 2016）。利用 RNAi 沉默朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus TcGSTM*7 基因表达后，该螨对丁氟螨酯和甲氰菊酯的敏感性均显著提高（申光茂等，2018）。烟粉虱 *Bemisia tabaci* 体内 *GST*14 被沉默后，其在噻虫嗪胁迫下的死亡率显著提升，表明 *GST*14 能够明显提高烟粉虱对噻虫嗪的耐受性（Yang *et al.*, 2016b），类似功能也出现在东亚飞蝗 *LmGSTs*3 基因的研究中（Qin *et al.*, 2012）。最新研究发现，柑橘木虱 *Diaphorina citri DcGSTe*2 和 *DcGSTd*1 两个基因的共沉默，可导致柑橘木虱对甲氰菊酯和噻甲氧胺的抗性水平进一步提升（Yu and Killiny, 2018）。本研究采用 RNAi 技术研究烟草甲 *LsGSTe*1 与甲酸乙酯代谢解毒的关系，发现沉默 *LsGSTe*1 后，烟草甲对 LC_{30}（10 μL/L）的甲酸乙酯敏感性没有发生显著性变化，而对 LC_{50}（20 μL/L）的敏感性显著上升（死亡率提高 32.4%），推测 *LsGSTe*1 基因可能参与烟草甲对甲酸乙酯的体内解毒代谢。类似的结果出现在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 细胞色素 P450 氧化还原酶的研究中，发现目的基因沉默后，与对照组相比，棉铃虫对低浓度溴氰菊酯的敏感性无显著差异，而高浓度处理组棉铃虫死亡率显著增加（汪丹，2011）。昆虫在应对低剂量/浓度的农药胁迫过程中，多种解毒代谢基因共同参与杀虫剂的解毒代谢，具有一定的协同效应（Liu *et al.*, 2017）。因此，我们推测烟草甲在低浓度的甲酸乙酯的胁迫下，其他类解毒代谢酶基因可能在这一时期发挥着关键作用。

综上所述，本研究利用 RT-PCR 技术克隆获得烟草甲谷胱甘肽 *S*-转移酶基因 *LsGSTe*1 的 cDNA 全长序列，该基因在烟草甲高龄幼虫和脂肪体中表达较高，暗示其可能参与烟草甲对外源物质的解毒代谢。进一步研究抑制 *LsGSTe*1 基因的表达后，烟草甲对甲酸乙酯的敏感性与对照组相比明显提高，表明 *LsGSTe*1 在烟草甲响应甲酸乙酯胁迫并参与代谢过程中发挥了关键作用。

参考文献（References）

Agianian B, Tucker PA, Schouten A, Leonard K, Bullard B, Gros P, 2003. Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione *S*-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *J. Mol. Biol.*, 326(1): 151-165.

Alias Z, Clark AG, 2010. Adult *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferases: effects of acute treatment with methyl parathion. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 98(1): 94-98.

Feng QL, Davey KG, Pang ASD, Ladd TR, Retnakaran A, Tomkins BL, Zheng SC, Palli SR, 2001. Developmental expression and stress induction of glutathione *S*-transferase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Insect Physiol.*, 47(1): 1-10.

Han JB, Li GQ, Wan PJ, Zhu TT, Meng QW, 2016. Identification of glutathione *S*-transferase genes in *Leptinotarsa decemlineata* and their expression patterns under stress of three insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 133: 26-34.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 653-665.

Hironaka M, Kamura T, Osada M, Sasaki R, Shinoda K, Hariyama T, Miyatake T, 2017. Adults of *Lasioderma serricorne* and *Stegobium paniceum* (Anobiidae: Coleoptera) are attracted to ultraviolet (UV) over blue light LEDs. *J. Econ. Entomol.*, 110(4): 1911-1915.

Hori M, 2003. Repellency of essential oils against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 38(4): 467-473.

Hou Y, Zou Y, Wang F, Gong J, Zhong XW, Xia QY, Zhao P, 2010. Comparative analysis of proteome maps of silkworm hemolymph during different developmental stages. *Proteome Sci.*, 8: 45.

Hu F, Dou W, Wang JJ, Jia FX, Wang JJ, 2014. Multiple glutathione *S*-transferase genes: identification and expression in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Pest Manag. Sci.*, 70(2): 295-303.

Imai T, Masuda R, 2017. Insecticidal activities of methyleugenol and β-

asarone, from the herbal medicines Saishin and Sekishōkon, and other alkoxy-propenyl-benzene derivatives against the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 52(2): 183 – 188.

Keeling CI, Yuen MM, Liao NY, Docking TR, Chan SK, Taylor GA, Palmquist DL, Jackman SD, Nguyen A, Li M, Henderson H, Janes JK, Zhao Y, Pandoh P, Moore R, Sperling FA, Huber DP, Birol I, Jones SJ, Bohlmann J, 2013. Draft genome of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major forest pest. *Genome Biol.*, 14(3): R27.

Li C, Li ZZ, Cao Y, Zhou B, Zheng XW, 2009. Partial characterization of stress-induced carboxylesterase from adults of *Stegobium paniceum* and *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) subjected to CO_2-enriched atmosphere. *J. Pest Sci.*, 82(1): 7 – 11.

Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanism of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231 – 253.

Liu S, Rao XJ, Li MY, Feng MF, He MZ, Li SG, 2015. Glutathione *S*-transferase genes in the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae): identification and expression profiles. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 90(1): 1 – 13.

Liu S, Zhang YX, Wang WL, Zhang BX, Li SG, 2017. Identification and characterisation of seventeen glutathione S-transferase genes from the cabbage white butterfly *Pieris rapae*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 143: 102 – 110.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, Hemingway J, Ranson H, 2005. Elevated activity of an epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(8): 861 – 871.

Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L, Somboon P, Lycett G, Ranson H, 2011. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(3): 203 – 209.

Nicholas V, Ebert PR, 2006. Comparative toxicity of fumigants and a phosphine synergist using a novel containment chamber for the safe generation of concentrated phosphine gas. *PLoS ONE*, 1(1): e130.

Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J, 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*, 373(Pt 3): 957 – 963.

Qin GH, Jia M, Liu T, Zhang XY, Guo YP, Zhu KY, Ma EB, Zhang JZ, 2012. Heterologous expression and characterization of a sigma glutathione *S*-transferase involved in carbaryl detoxification from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *J. Insect Physiol.*, 58(2): 220 – 227.

Samra AI, Kamita SG, Yao HW, Cornel AJ, Hammock BD, 2012. Cloning and characterization of two glutathione *S*-transferases from pyrethroid-resistant *Culex pipiens*. *Pest Manag. Sci.*, 68(5): 764 – 772.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*, 360(Pt 1): 1 – 16.

Shen GM, Li H, Liang JH, He L, 2018. *In vitro* expression of *TcGSTM7* of *Tetranychus cinnabarinus* and its function. *Sci. Agric. Sin.*, 51(5): 905 – 913. [申光茂, 李恒, 梁金辉, 何林, 2018. 朱砂叶螨 *TcGSTM7* 的体外表达及其功能. 中国农业科学, 51(5): 905 – 913]

Shi HX, Pei LH, Gu SS, Zhu SC, Wang YY, Zhang Y, Li B, 2012. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*, 100(5): 327 – 335.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725 – 2729.

Tang PA, Deng YX, Wang JJ, Yang LD, Yang ZL, Jiang TK, 2007. Studies on the fumigation activities of ethyl formate against four stored-product insects in simulant storehouse. *Grain Stor.*, 36(1): 3 – 6. [唐培安, 邓永学, 王进军, 杨龙德, 杨自力, 蒋天科, 2007. 模拟仓中甲酸乙酯对 4 种储粮害虫的熏蒸活性研究. 粮食储藏, 36(1): 3 – 6]

Wang D, 2011. Molecular Cloning, mRNA Expression and RNAi of NADPH-cytochrome P450 Reductase Gene in *Helicoverpa armigera* (Hübner). PhD Dissertation, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [汪丹, 2011. 棉铃虫 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因的克隆、时空表达及 RNA 干扰. 南京: 南京农业大学博士学位论文]

Wang YG, Gao ZH, Bo SH, Zhao SR, Lu XL, 2008. Study on the fumigant prevention of the *Trogoderma variabile* with ethyl formate. *J. North. For. Univ.*, 23(6): 135 – 137. [王云果, 高智辉, 卜书海, 赵姝荣, 鲁晓琳, 2008. 甲酸乙酯对花斑皮蠹熏蒸防治研究. 西北林学院学报, 23(6): 135 – 137]

Xu KK, Ding TB, Yan Y, Li C, Yang WJ, 2017. Expression analysis of glutathione *S*-transferase genes in *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) subjected to CO_2-enriched atmosphere. *J. Zhejiang Univ.* (*Agric. Life Sci.*), 43(5): 599 – 607. [许抗抗, 丁天波, 严毅, 李灿, 杨文佳, 2017. CO_2 气调胁迫下烟草甲谷胱甘肽 *S*-转移酶基因的表达分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 43(5): 599 – 607]

Yang WJ, Xu KK, Cao Y, Meng YL, Liu Y, Li C, 2019. Identification and expression analysis of four small heat shock protein genes in cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius). *Insects*, 10(5): 139.

Yang WJ, Xu KK, Shang F, Dou W, Wang JJ, 2016a. Identification and characterization of three juvenile hormone genes from *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.*, 99(4): 648 – 657.

Yang X, He C, Xie W, Liu YT, Xia JX, Yang ZZ, Guo LT, Wen YN, Wang SL, Wu QJ, Yang FS, Zhou XM, Zhang YJ, 2016b.

Glutathione S-transferases are involved in thiamethoxam resistance in the field whitefly *Bemisia tabaci* Q (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 134: 73–78.

Yao J, Dai RH, Yang H, Liao YJ, 2016. Fumigation activity of ethyl formate against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Plant Quarant.*, 30(4): 17–20. [姚洁, 戴仁怀, 杨洪, 廖应江, 2016. 甲酸乙酯熏蒸菜豆象的初步研究. 植物检疫, 30(4): 17–20]

You YC, Xie M, Ren NN, Cheng XM, Li JY, Ma XL, Zou MM, Vasseur L, Gurr GM, You MS, 2015. Characterization and expression profiling of glutathione *S*-transferases in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *BMC Genomics*, 16: 152.

Yu Q, Lu C, Li B, Fang S, Zuo W, Dai F, Zhang Z, Xiang Z, 2008. Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione *S*-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1158–1164.

Yu XD, Killiny N, 2018. RNA interference of two glutathione S-transferase genes, *Diaphorina citri DcGSTe2* and *DcGSTd1*, increases the susceptibility of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) to the pesticides fenpropathrin and thiamethoxam. *Pest Manag. Sci.*, 74(3): 638–647.

Yu XD, Liu ZC, Huang SL, Chen ZQ, Sun YW, Duan PF, Ma YZ, Xia LQ, 2016. RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest Manag. Sci.*, 72(6): 1090–1098.

（责任编辑：马丽萍）